

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 39 38 598 A 1**

⑳ Aktenzeichen: P 39 38 598.1
㉑ Anmeldetag: 21. 11. 89
㉒ Offenlegungstag: 23. 5. 91

㉓ Int. Cl. 5:
G 01 N 33/533
G 01 N 21/64
B 05 D 1/20
C 03 C 17/28
C 04 B 41/82
// C 09 B 69/10, 57/02,
23/02

DE 39 38 598 A 1

㉔ Anmelder:
Bayer AG, 5090 Leverkusen, DE

㉕ Erfinder:
Hugl, Herbert, Dipl.-Chem. Dr., 5060 Bergisch
Gladbach, DE; Kuckert, Eberhard, Dipl.-Chem. Dr.,
5090 Leverkusen, DE; Möbius, Dietmar, Dipl.-Chem.
Dr., 3401 Waake, DE; Ohst, Holger, Dipl.-Chem. Dr.,
5068 Odenthal, DE; Rolf, Meinhard, Dipl.-Chem. Dr.,
5090 Leverkusen, DE; Rosenkranz, Hans-Jürgen,
Dipl.-Chem. Dr.; Schopper, Heinrich-Christian,
Dipl.-Phys. Dr.; Siegmund, Hans-Ulrich, Dipl.-Chem.
Dr., 4150 Krefeld, DE; Sommer, Klaus, Dipl.-Phys.
Dr., 5000 Köln, DE; Wehrmann, Rolf, Dipl.-Chem. Dr.,
4150 Krefeld, DE

㉖ **Optischer Biosensor**

Ein neuer optischer Biosensor auf der Basis des Fluoreszenz-Energietransfers besteht aus

- a) einem festen Träger,
- b) einer auf a) angebrachten ein- oder mehrlagigen Langmuir-Blodgett(LB)-Schicht,
- c) mindestens einem Fluoreszenzfarbstoff F_1 , der in mindestens einer der oberen 4 Lagen der LB-Schicht angeordnet ist,
- d) einem zur biologischen Wechselwirkung befähigten Molekül (Rezeptor), das in oder an der obersten Lage der LB-Schicht gebunden oder angeordnet ist, und
- e) einem mobilen Fluoreszenzfarbstoff F_2 , dessen Anregungsbande für einen Energietransfer ausreichend mit der Emissionsbande von F_1 überlappt und der kovalent an einen Liganden gebunden ist, der an den Rezeptor bindungsfähig ist oder der kovalent an einen anderen Rezeptor gebunden ist, der an den Komplex aus erstem Rezeptor und Ligand bindungsfähig ist, wobei der Ligand bzw. der Ligand und der zweite Rezeptor zunächst nicht an die LB-Schicht gebunden sind.

DE 39 38 598 A 1

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft einen optischen Biosensor mit einem neuartigen Aufbau für eine Detektionsmethode für Moleküle, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind, zur Erkennung gelöster Substanzen oder gelöster Analyte, wie sich beispielsweise wie Antigen und Antikörper verhalten. Es handelt sich hierbei um einen Festphasensensor mit Fluoreszenzfarbstoff, der einen Energietransferprozeß auf ein zu detektierendes, mit einem zweiten Fluoreszenzfarbstoff markiertes Molekül erlaubt.

Es gibt verschiedene Methoden, Analyten, wie Hormone, Enzyme, andere Proteine, Kohlehydrate, Nucleinsäuren, pharmakologische Wirkstoffe, Toxine und andere, in flüssigen Proben biologischen Ursprungs nachzuweisen. Unter den bekannten Methoden ragen speziell Immunoassays als eine empfindliche Nachweismethode zur Bestimmung sehr kleiner Mengen organischer Substanzen heraus. Immunoassay-Methoden beruhen allgemein auf der Fähigkeit eines Rezeptormoleküls, beispielsweise eines Antikörpers, die Struktur und molekulare Organisation eines Ligandenmoleküls, sei sie durch unpolare und/oder polare Wechselwirkungen definiert, spezifisch zu erkennen und dieses Molekül auf derartige Weise ganz spezifisch zu binden.

Immunoassays werden mit verschiedenen Methoden durchgeführt. Dazu zählen der Einsatz verschiedener Markierungstechniken, meist radioaktiver, enzymgekoppelter und auch fluoreszierender Natur (Methods in Enzymology, 74 (1981), 28—60).

Einige dieser bekannten Immunoassay-Methoden beinhalten die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoff-Molekülen F_1 , die in der Lage sind, Licht einer Wellenlänge λ_1 zu absorbieren und Licht einer zweiten, größeren Wellenlänge λ_2 zu emittieren. In Gegenwart eines anderen Fluoreszenzfarbstoff-Moleküls F_2 erfolgt unter bestimmten Bedingungen nach der Anregung von F_1 durch Licht der Wellenlänge λ_1 eine strahlungslose Energieübertragung auf F_2 , der dann seinerseits Licht einer dritten, noch größeren Wellenlänge λ_3 emittiert.

Dieses Prinzip des Energietransfers ist von Förster in der Theorie beschrieben worden und ist Anregung für vielerlei mögliche Anwendungen gewesen (Annual Reviews in Biochemistry 47 (1978), 819—846). Eine wichtige Eigenschaft dieses Energietransfers ist dabei seine Abstandsabhängigkeit. Die Wirksamkeit der Energieübertragung nach Förster wird durch den kritischen Radius R_0 , nämlich den Abstand zwischen Donor und Akzeptor, beschrieben, bei dem der Betrag des intermolekularen Energietransfers gleich der Summe aller anderen Desaktivierungsprozesse des Donors ist. Dieser Abstand beträgt etwa 50—100 Å. Analog zu R_0 kann eine "kritische Konzentration" C_0 des Akzeptors berechnet werden. Vereinfacht kann die zwischen R_0 und C_0 des Akzeptors

vorhandene Beziehung durch $R_0(\text{Å}) = \frac{7,35}{C_0^{1/3}}$ wiedergegeben werden.

Es sind bereits Immunoassays beschrieben worden, die auf der Ausnützung des abstandsabhängigen Energietransfers beruhen. So wird in EP 150 905 ein in homogener Lösung arbeitender Immunoassay beschrieben, in dem Analyt bzw. Antigen mit einem Fluoreszenzfarbstoff F_1 markiert und der dazu spezifisch bindende Antikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff F_2 versehen wurde. Zum Nachweis der spezifischen Bindung und damit als analytische Methode wird die Tatsache genutzt, daß beim Einstrahlen von Licht der Wellenlänge λ_1 eine Emission der Wellenlänge λ_3 nur dann beobachtet werden kann, wenn Analyt und Antikörper in ausreichender Konzentration in für eine Energieübertragung nach Förster genügend kleinem Abstand vorliegen. Dies ist nur dann der Fall, wenn Analyt und Antikörper eine spezifische Bindung eingegangen sind.

In einem anderen Beispiel wird einer der beiden markierten Bindungspartner an einer Festkörperoberfläche angebracht und der entsprechend spezifisch bindende Partner aus einer homogenen Lösung gebunden. Wieder erfolgt der Nachweis der spezifischen Bindung, wie oben bereits erläutert, durch einen entsprechenden Energietransfer mittels der Evanescent-wave-Technologie (Nature 320 (1986), 179—181).

Sowohl der hier erwähnte Energietransfer in homogener Lösung als auch der beschriebene Festphasen-Immunoassay mit Energietransfer haben prinzipiell den Nachteil, daß die spezifisch miteinander bindenden Moleküle jeweils mit einem der beiden notwendigen Fluoreszenzfarbstoffe F_1 und F_2 markiert werden müssen, bzw. maximal ein Verhältnis $F_1 : F_2$ von 2 : 1 gestatten. Es ist bereits beschrieben worden, die durch das Verhältnis der beiden Fluoreszenzfarbstoffe F_1 und F_2 limitierte Empfindlichkeit des fluoreszenzspektroskopischen Nachweises zu verbessern. So wird in EP 1 74 744 vorgeschlagen, mehrere organische Farbstoffmoleküle gleichzeitig an ein "lichtsammelndes" Protein kovalent zu binden, d. h. es erfolgt ein Energietransfer mehrerer organischer Farbstoffmoleküle an nur ein Akzeptormolekül, nämlich ein Phycobiliprotein (Allophycocyanin). Dieses Molekülsystem wiederum wird dann als ein "Marker" für andere biologische Moleküle vorgeschlagen. Die Methode wird begrenzt durch das Farbstoff : Protein-Kupplungsverhältnis, d. h. die Nachweisgrenzen der Methoden sind auf die Empfindlichkeit der Fluoreszenzspektroskopie beschränkt.

Weiterhin ist ein Nachteil der aufgeführten Systeme dadurch gegeben, daß komplementäre Systeme jeweils spezifisch markiert werden müssen und damit nicht vielseitig verwendet werden können. Ein weiterer Nachteil des in heterogener Phase aufgebauten Systems ist die spezielle verwendete Evanescent-wave-Technik. Zudem ist die Fixierung der spezifisch bindenden Moleküle an die Festkörperoberfläche über ein System aus Kupplungskomponente/Antikörper/Antigen/Antikörper präparativ sehr aufwendig. Ein weiterer prinzipieller Nachteil dieser Festphasen-Technologie bei Immunoassays ist die reproduzierbare Herstellung von Beschichtungen der Testmatrix mit den Reaktanden der Immunreaktion. Für analytische Methoden ist jedoch neben Empfindlichkeit und Selektivität bezüglich einer Zielsubstanz die Reproduzierbarkeit ein wesentliches Qualitätsmerkmal.

Die vorliegende Erfindung betrifft einen neuartig aufgebauten Sensor für eine Detektionsmethode von mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Molekülen zur Erkennung dieser gelösten Substanzen oder Analyte durch Energietransfer mit einer einfachen Fluoreszenztechnik und gesteigerter Empfindlichkeit in der Detektion sowie vielseitiger Anwendung bei unterschiedlichen Aufgaben und reproduzierbarer Herstellungsmöglichkeit für an Festkörperoberflächen gebundenen Schichten. Neben dem deutlichen Gewinn an Sensitivität werden alle oben

aufgeführten Nachteile gleichzeitig vermieden.

Die Erfindung betrifft einen optischen Biosensor auf der Basis des Fluoreszenz-Energietransfers, bestehend aus

- a) einem festen Träger,
- b) einer auf a) angebrachten ein- oder mehrlagigen Langmuir-Blodgett(LB)-Schicht,
- c) mindestens einem Fluoreszenzfarbstoff F_1 , der in mindestens einer der oberen 4 Lagen der LB-Schicht angeordnet ist,
- d) einem zur biologischen Wechselwirkung befähigten Molekül (Rezeptor), das in oder an der obersten Lage der LB-Schicht gebunden oder angeordnet ist, und
- e) einem mobilen Fluoreszenzfarbstoff F_2 , dessen Anregungsbande für einen Energietransfer ausreichend mit der Emissionsbande von F_1 überlappt und der kovalent an einen Liganden gebunden ist, der an den Rezeptor bindungsfähig ist oder der kovalent an einen anderen Rezeptor gebunden ist, der an den Komplex aus erstem Rezeptor und Ligand bindungsfähig ist, wobei der Ligand bzw. der Ligand und der zweite Rezeptor zunächst nicht an die LB-Schicht gebunden sind.

Als Träger kommen alle dem Fachmann für die LB-Technik geeigneten Träger in Frage, wie Glas, Quarzglas, Porzellan, Silizium, Metalle, bevorzugt korrosionsfeste Edel- und Halbedelmetalle oder solche, die durch Oberflächenbehandlung eine korrosionsfeste Oberfläche ausbilden, wobei die LB-Beschichtung ihrerseits die Metalloberfläche korrosionsfest macht, Kunststoffe, wie Polymethylmethacrylat, Polycarbonat, Polystyrol und andere metallisierte Kunststoffe. In bevorzugter Weise handelt es sich um Träger aus Glas, Quarzglas, Silizium, Kunststoff oder einem metallisierten Kunststoff. Weiterhin bevorzugte Träger sind optisch transparent. Alle Trägermaterialien sind weiterhin durch eine gleichmäßige Oberfläche, bevorzugt durch eine ebene Oberfläche, ausgezeichnet.

Auf solche Träger werden mit Hilfe der LB-Technik eine oder mehrere monomolekulare Schichten aufgebracht. Diese geordneten LB-Schichten können aus niedermolekularen oder polymeren Amphiphilen, bevorzugt aus polymeren Amphiphilen, bestehen und kovalent gebundene Fluoreszenzchromophorefarbstoffe und/oder amphiphile Fluoreszenzfarbstoffe, die im folgenden als F_1 bezeichnet werden, enthalten.

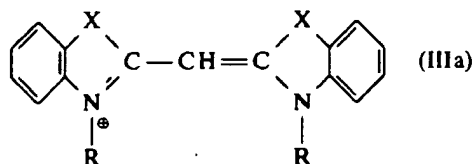
Weiterhin sind in diesen LB-Schichten funktionelle Moleküle, beispielsweise Glykolipide, Proteine, Haptene und andere, enthalten oder damit kovalent verknüpft. An diese funktionellen Moleküle kann nun eine spezifische Bindung eines hierzu komplementären Moleküls, wie ein Lectin, ein Antigen, ein Antikörper und andere, das mit einem zweiten, zu F_1 für einen Energietransfer passenden Fluoreszenzfarbstoff F_2 markiert ist, erfolgen. Hierbei soll der sogenannte Förster-Abstand, wie er für den oben beschriebenen Energietransfer nötig ist, eingehalten werden. Diese Bedingung wird durch die Anwendung der LB-Technik gewährleistet, die eine gezielte molekulare Architektur in Dimensionen von etwa 15–40 Å, beispielsweise in der Nähe von 20 Å gestattet. Wird das im vorangegangenen beschriebene System nun mit Licht der Wellenlänge λ_1 angeregt, so läßt sich eine Emission des Fluoreszenzfarbstoffes F_2 mit einer Wellenlänge λ_2 detektieren, die als Nachweis für die Bindung des mit F_2 markierten Moleküls an der Sensoroberfläche, die mit F_1 dotiert ist, gilt. Die Anregung mit Licht der Wellenlänge λ_1 kann so erfolgen, daß F_1 in der LB-Schicht durch den optisch transparenten Träger hindurch in Transmission oder durch Evanescent-wave-Technik, wenn der optisch transparente Träger als Lichtleiter fungiert, oder aber durch direkte Bestrahlung angeregt wird.

Insbesondere bei einem hohen Überschuß an F_1 wird zusätzlich eine Fluoreszenz-Emission der Wellenlänge λ_2 beobachtet, die auf der Fluoreszenz von F_1 -Molekülen beruht, die nach ihrer Anregung nicht strahlungslos deaktiviert werden.

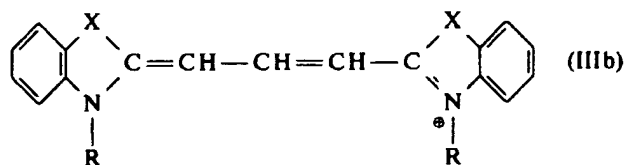
Der so beschriebene Sensoraufbau kann in dieser Funktion nicht nur einen in Lösung vorhandenen Analyten, der mit Fluoreszenzfarbstoff F_2 markiert ist, nachweisen; der Sensoraufbau kann auch genutzt werden, um in einer kompetitiven Funktionsweise einen nichtfluoreszenzmarkierten Analyten nachzuweisen. Hierzu werden bei der Präparation des Sensors die spezifisch bindenden Stellen der funktionellen Moleküle in der LB-Schicht mit fluoreszenzmarkierten, komplementär bindenden Molekülen abgesättigt. Man beobachtet dann bei Anregung mit Licht der Wellenlänge λ_1 eine maximale Fluoreszenz-Emission der Wellenlänge λ_2 , deren Abnahme über einen zeitlichen Verlauf beobachtet werden kann, wenn bei Kontakt mit der zu untersuchenden Lösung das mit F_2 fluoreszenzmarkierte, komplementär bindende Molekül in einer Gleichgewichtsreaktion durch nichtfluoreszenzmarkierte, komplementär bindende Moleküle des gleichen Typs verdrängt werden.

Für den Aufbau von LB-Schichten verwendet man amphiphile Moleküle, d. h. Moleküle, die ein hydrophiles Ende (einen "Kopf") und ein hydrophobes Ende (einen "Schwanz") haben. Solche amphiphilen Moleküle können niedermolekulare Verbindungen mit einem Molekulargewicht von bis etwa 2000 sein. In einer weiteren Variante können diese niedermolekularen Amphiphile polymerisationsfähige bzw. zur Polykondensation und Polyaddition befähigte funktionelle Gruppen enthalten, so daß nach dem Aufbau der LB-Schichten aus niedermolekularen Amphiphilen in einer nachträglichen Reaktion in der LB-Schicht diese Amphiphile zu hochmolekularen Verbindungen verknüpft werden können. Diese nachträgliche Reaktion zu hochmolekularen Verbindungen ist deshalb von Vorteil, weil LB-Schichten aus polymeren Amphiphilen höhere thermische und mechanische Stabilitäten aufweisen. Insbesondere die Verwendung polymerer Amphiphile ist für die Herstellung stabiler LB-Schichten besonders geeignet, um die Erfordernisse der dargelegten Anwendung zu erfüllen. Beispiele für polymere Amphiphile, wie sie für den erfindungsgemäßen optischen Biosensor geeignet sind, sind α -Olefin-Maleinsäureanhydrid-Copolymere (British Polymer Journal 17 (1985), 368 ff; J. Macromol. Sci.-Phys. B 23 (1985), 549–573), Polyoctadecyl-methacrylat, Polyvinylstearat (J. Coll. Interface Sci. 86 (1982), 485), Polyvinylphosphorlipide (Angew. Chem. 100 (1988), 117–162), Cellulose-tristearat und amphiphile Polyamide (DE-OS 38 30 325). In bevorzugter Weise für die Herstellung stabiler LB-Schichten sind Polyurethane gemäß DE-OS 38 27 438 und

Bei den hier beispielhaft genannten Substanzen für LB-Mono- und -Multischichten ist der Fluoreszenzchromophor an das amphiphile Polymer kovalent geknüpft. Wenngleich diese Anordnung die größtmögliche Stabilität der F₁ enthaltenden LB-Schichten ermöglicht, ist es aber auch möglich, F₁ enthaltende LB-Schichten durch Cospreiten eines amphiphilen Polymers mit amphiphilen Fluoreszenzfarbstoffen auf der Wasseroberfläche vor dem Beschichtungsvorgang zu erzielen. Als Beispiele für solche amphiphile Fluoreszenzfarbstoffe, die mit amphiphilen Polymeren, welche keine Chromophore enthalten, gemeinsam eingesetzt werden können, sind etwa Cyaninfarbstoffe der Typen



und

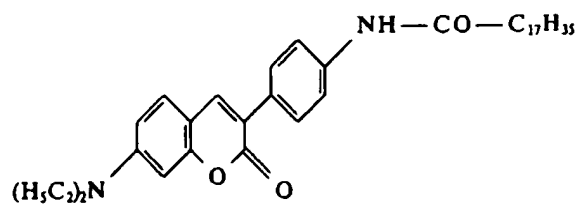


in denen

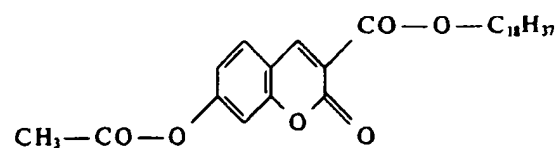
X für Sauerstoff oder Schwefel und

R für geradkettiges C₁₄–C₂₂-Alkyl stehen.

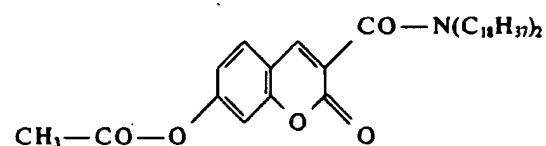
Weitere Beispiele für dem Fachmann grundsätzlich bekannte und erfindungsgemäß einsetzbare Fluoreszenzfarbstoffe sind Cumarinfarbstoffe der folgenden Typen:



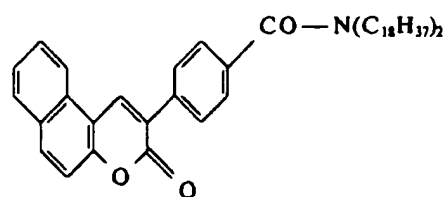
(IVa)



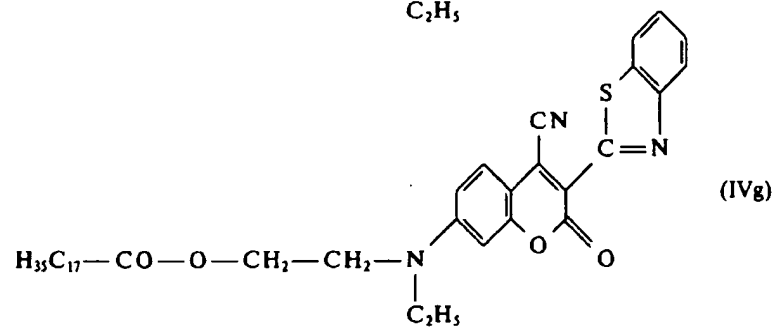
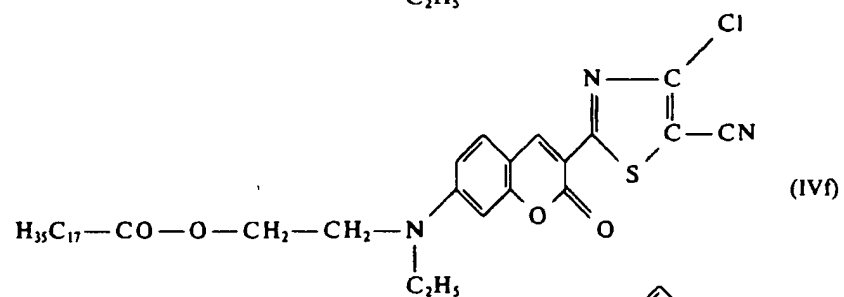
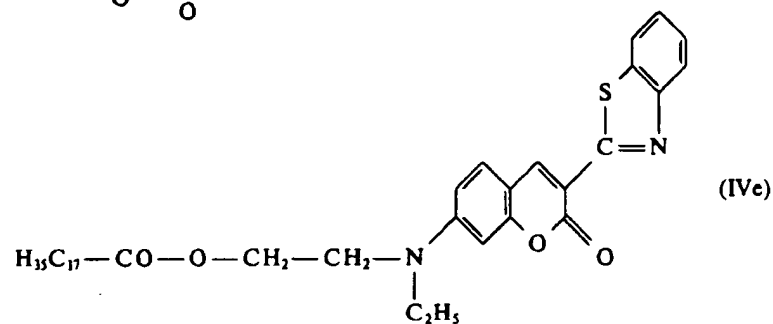
(IVb)

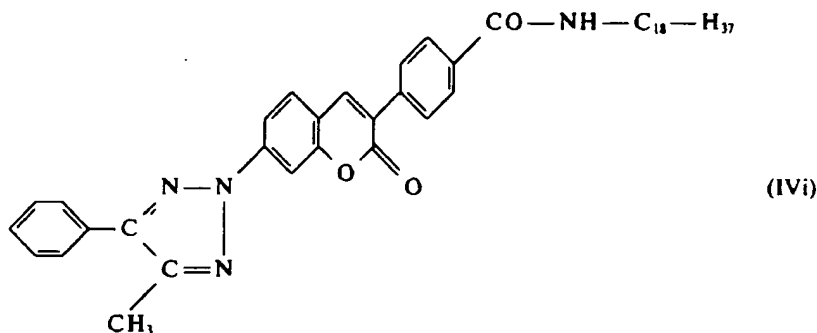
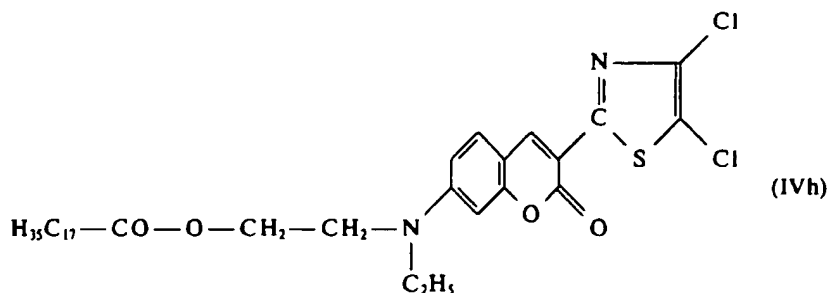


(IVc)



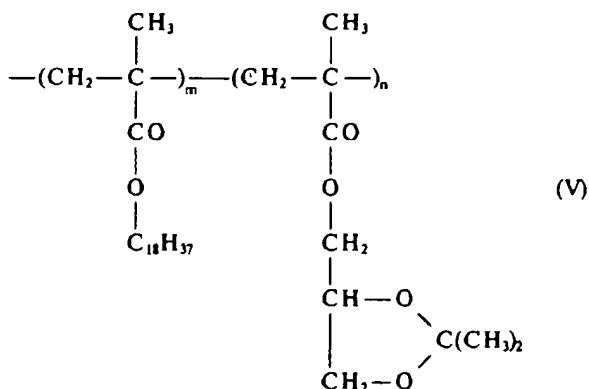
(IVd)





Diese Aufzählung ist nur beispielhaft. Weitere amphiphile Fluoreszenzfarbstoffe sind beschrieben in der Monographie Physical Methods of Chemistry, Vol. 1, Part. 3B, S. 577 ff, John Wiley, New York 1972. Will man solche amphiphile Fluoreszenzfarbstoffe in LB-Schichten einbringen, muß auf eine gleichmäßige Verteilung des Farbstoffs in der gesamten Schicht geachtet werden. So ist zu vermeiden, daß die Übertragung einzelner Schichten nicht bei einem solchen angelegten Schub erfolgt, bei dem ein Coexistenzbereich der festanalogen- und flüssiganalogen Phase durchlaufen wird, da der amphiphile Fluoreszenzfarbstoff in der Regel in den beiden Phasen nicht die gleiche Löslichkeit besitzt und so inhomogene, für die Sensoranwendung weniger geeignete Schichten gebildet werden. Diese Erscheinung ist bei LB-Schichten aus niedermolekularen Substanzen bekannt (Angew. Chem. 100 (1988), 750); auch bei polymerisierten Phosphorlipiden ist diese Erscheinung beobachtet worden (Polymer Sci. 267 (1989), 97–107).

Bei der Herstellung erfindungsgemäßer optischer Biosensoren wurde überraschenderweise gefunden, daß LB-Schichten aus Polymeren der Formel (II) beim Anlegen von Schüben bis zum Zusammenbruch der LB-Schicht bei > 45 mN/m Schub nicht zur Ausbildung phasenseparierter Domänen neigen. Dies gilt neben Polymeren der Formel (II) auch für eine Mischung aus einem Polymer vom Typ der Formel (V) und einem Farbstoff, beispielsweise der Formel (IV), wobei das Polymer vom Typ der Formel (V) als "Matrix" anzusehen ist, in welcher sich 0,1 bis 25 Mol-% des amphiphilen Farbstoffs, beispielsweise der Formel (IV) aufhalten können.



Derart hergestellte LB-Schichten zeigen sowohl auf Wasser als Subphase als auch nach dem Übertragen auf einen festen Träger lichtmikroskopisch homogene Schichten ohne Störungen und sind für die erfindungsgemäßen Biosensoren besonders geeignet.

Eine weitere Steigerung der Empfindlichkeit des erfindungsgemäßen optischen Biosensors kann erreicht werden, wenn Fluoreszenzfarbstoffe F₁ als Donor in LB-Schichten verwendet werden, die aufgrund ihres speziellen Verhaltens Aggregate mit fluoreszenzspektroskopischen Eigenschaften, die von denen des monomeren Farbstoffs sehr verschieden sind und die sich in der Regel durch eine entsprechend schärfere und intensivere

Absorptionsbande und entsprechend schärfere und intensivere Fluoreszenz-Emissionsbande auszeichnen. Solche Aggregate sind dem Fachmann als J-Aggregate oder Scheibe-Aggregate bekannt (Physical Methods of Chemistry, Vol. 1, Part. 3B, S. 579, John Wiley, New York 1972). Mit dem speziellen Verhalten solcher J-Aggregate kann zum einen eine sehr hohe Farbstoffdichte F_1 in den LB-Schichten und zum anderen aufgrund der starken Absorption von Licht der Wellenlänge λ_1 eine hohe Energiedichte, die nach der Theorie von Förster auf entsprechende Moleküle F_2 übertragen werden kann, erreicht werden. Die hohe Schärfe der Emissionsbande bedeutet sowohl einen Verstärkungseffekt des Meßsignals, als auch eine Verminderung der Störstrahlung durch geringere Überlappung der Emissionen von F_1 mit F_2 .

Fluoreszenzfarbstoffe, die in LB-Schichten in der Lage sind, J-Aggregate zu bilden, sind in der obengenannten Literatur beschrieben worden. Beispielhaft seien genannt: Cyaninfarbstoffe sowie Spiropyrane, die nach photochemischer Anregung in Merocyanine übergehen und dann J-Aggregate bilden (Thin Solid Films 133 (1985), 21–28).

Der Einbau funktioneller Moleküle in die den Fluoreszenzfarbstoff F_1 enthaltende LB-Schicht kann auf unterschiedliche Art und Weise erfolgen:

- Das funktionelle Molekül kann kovalent, gegebenenfalls unter Verwendung von Spacer-Molekülen, an die LB-Schicht geknüpft sein, sei es von Beginn des Spreitungsvorganges auf der Wasseroberfläche an oder durch eine nachträgliche Kupplungsreaktion an die LB-Schicht entweder auf der Subphase oder nach Aufbringen der LB-Schicht auf einen festen Träger.
- Das funktionelle Molekül kann als Amphiphil mitgespreitet und so physikalisch mit "Anker" in die LB-Schicht eingebaut werden.

Für beide Einbauvarianten sind aus der Literatur Methoden bekannt. Beispielsweise kann die Verknüpfung biologischer funktioneller Gruppen an LB-Schichten auf feste Träger in analoger Weise zu den aus der Biochemie dem Fachmann bekannten Immobilisierungsmethoden erfolgen (Methods in Enzymology, Vol. 135 und Vol. 136 (1987)). Mit langen Alkylketten versehene Moleküle werden in DE-OS 35 46 150 als Membrananker-Wirkstoffkonjugate in großer Auswahl genannt und können durch Cospreiten auf der Subphase in den LB-Film eingebaut werden. Als ein Beispiel für solche amphiphilen funktionellen Moleküle seien Glykolipide, insbesondere Ceramide, genannt. Weitere Beispiele sind Antikörper/Antigen-Systeme sowie komplementäre Nucleotidsequenzen. Eine große Anzahl solcher Beispiele ist dem Fachmann bekannt (Angew. Chem. 100 (1988), 117–162).

Entscheidend für die Steigerung der Empfindlichkeit des Sensorsystems ist ein möglichst hohes Verhältnis $F_1 : F_2$ innerhalb des "Förster-Radius" und damit eine entsprechende Verstärkung des Fluoreszenzsignals eines mit F_2 markierten Moleküls nach erfolgter Bindung an eine mit F_1 dotierte Oberfläche. Es ist demnach vorteilhaft, möglichst viele F_1 -Chromophore in den obersten LB-Schichten, insbesondere in den obersten vier Lagen einzubringen. In besonders bevorzugter Weise ist der Farbstoff F_1 in mindestens einer der beiden oberen Lagen angeordnet.

Wenngleich in der Fluoreszenzspektroskopie üblicherweise Konzentrationen an Fluoreszenzfarbstoff unter 1% verwendet werden, um Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Farbstoffmolekülen und damit Änderungen ihres Fluoreszenzverhaltens zu vermeiden, ist es im erfindungsgemäßen optischen Biosensor dennoch vorteilhaft, den Fluoreszenzfarbstoff F_1 in hohen Konzentrationen in die LB-Schichten einzubringen. Damit kann die Konzentration den großen Bereich von 0,1–99%, bevorzugt 5–50 Mol-%, betragen. Insbesondere polymere amphiphile Fluoreszenzfarbstoffe zeigen eine geringere Tendenz zur Eigenlöschung und Eximerenbildung bei Farbstoffkonzentrationen bis zu 25 Mol-%.

Der erfindungsgemäße optische Biosensor zeigt weiterhin den Vorteil, daß unabhängig von den in die Schicht der festen Phase eingebrachten funktionellen Molekülen der für das Prinzip des Energietransfers erforderliche Farbstoff F_1 frei wählbar in weiten spektralen Bereichen in die LB-Schicht eingebracht werden kann. Dies bedeutet, daß zum einen das funktionelle Molekül nicht spezifisch mit F_1 markiert werden muß und zum anderen der spektrale Bereich von F_1 optimal für einen Energietransfer auf den als Marker verwendeten Farbstoff F_2 abgestimmt werden kann. Beispiele von Paaren sind das Polymer der Formel (IIa)/TRITC und das Cyanin der Formel (IIb) mit X = Sauerstoff und n = 18/TRITC, wobei TRITC für Tetramethylrhodamin-isothiocyanat steht.

Im erfindungsgemäßen optischen Biosensor wird weiterhin die Steigerung der Empfindlichkeit des Fluoreszenzspektroskopischen Nachweises dadurch erreicht, daß eine möglichst hohe Farbstoffkonzentration F_1 in die LB-Schicht eingebracht wird und somit mehrere Moleküle F_1 in den für den Energietransfer auf ein an die Schicht gebundenes Molekül F_2 notwendigen "Förster-Radius" gelangen. Dieser Aufbau, eine möglichst hohe Farbstoffdichte F_1 in der gleichen Schicht wie das funktionelle, spezifisch bindende Molekül einzubringen, ohne jedoch das funktionelle Molekül in lediglich stöchiometrischen Mengen zu markieren, erlaubt im Gegensatz zu den bisher bekannten, auf Energietransfer beruhenden Nachweismethoden eine viel günstigere Ausnutzung dieses Meßprinzips und damit eine deutlich erhöhte Empfindlichkeit.

Aus der Nutzung aller innerhalb des Förster-Radius von F_2 liegenden Farbstoffmoleküle F_1 folgert auch, daß nicht nur die laterale Verteilung von F_1 innerhalb der obersten LB-Schichten von entscheidender Bedeutung ist, sondern eine möglichst hohe Konzentration von F_1 auch in den darunterliegenden Schichten. Aus diesem Grund beschränkt sich das Meßprinzip auf Schichten bis zu etwa 100 Å wirksamer Schichtdicke, denn darunterliegende Moleküle F_1 können nach Anregung durch Licht ihre Energie nicht mehr auf den dann zu weit entfernten Farbstoff F_2 übertragen und würden das zu detektierende Signal, nämlich die Lichtemission der Wellenlänge λ_3 des durch Transfer angeregten Farbstoffs F_2 , durch ihre eigene Fluoreszenz mit der Wellenlänge λ_2 nur stören und die Empfindlichkeit des Nachweises unnötig herabsetzen.

Aus diesem Grund eignen sich für die Herstellung dünner Schichten (100 Å oder darunter), die F_1 enthalten, einzig die LB-Schicht-Technologie und die Chemisorption. Nämlich bereits die in der Dünnschichttechnologie

verbreitete Methode des Spin-coating bereitet mit minimalen Schichtdicken von 200 bis 500 Å Probleme. Gegenüber dem Aufbringen dünner Schichten durch Chemisorption besitzt die LB-Technik den Vorteil, daß die Schichten in ihrer Zusammensetzung sehr definiert eingestellt werden können, was für die Herstellung reproduzierbarer Oberflächen für Sensoren von entscheidender Bedeutung ist.

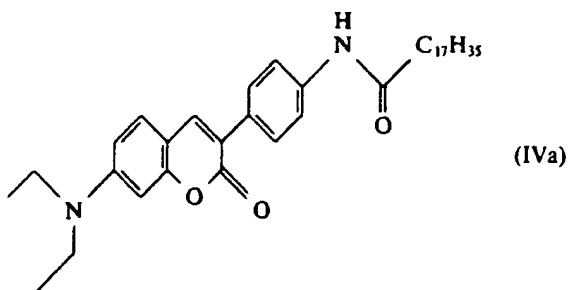
Der Donorfarbstoff F₁ und die bereits genannten aktiven Stellen zur Anbindung eines Biomoleküls können sich dabei auch in verschiedenen, übereinander liegenden LB-Schichten befinden. Die Gesamtzahl der aufgetragenen LB-Schichten bewegt sich im Zahlenbereich von 1 bis 10.

Zum erfindungsgemäßen optischen Biosensor gehören weiterhin mobile, fluoreszierende Moleküle der Farbstoffkomponente F₂, die an die fest in der LB-Schicht verankerten Rezeptormoleküle reversibel gebunden werden. Lediglich im einfachsten Fall, nämlich der Bestimmung eines selbstfluoreszierenden und damit als F₂ wirkenden Analyten, ist diese Komponente nicht erforderlich. Zum einen können die Bindungsstellen der Rezeptoren auf der LB-Schicht durch fluoreszenzmarkierte Derivate oder Analoga des Analytenmoleküls abgesättigt sein, die dann im Kontakt mit der Probenlösung vom Analyten kompetitiv verdrängt werden können. Zum anderen ist jedoch auch ein Sandwich-Immunoassay möglich, bei dem eine zweite Art von Rezeptoren, beispielsweise Antikörpern, entweder an den Komplex zwischen erstem Rezeptor und dem Analyten oder an eine Domäne des Analyten, die an der Bindung zum ersten Rezeptor nicht beteiligt ist, binden. Diese Methoden der Festphasen-Immunoassays sind prinzipiell Stand der Technik und beispielsweise in der Monographie P. Tijssen, Practice and Theory of Enzyme Immunoassays (R. H. Burdon, Ph. H. van Knippenberg, Herausgeber) Elsevier, Amsterdam 1985, dargestellt.

Beispiel 1

Herstellung eines amphiphilen Fluoreszenzfarbstoffs

Zu 1,53 g (5 mmol) 7-Diethylamino-3-(p-aminophenyl)-cumarin und 0,61 g (5 mmol) Triethylamin in 10 ml trockenem Chloroform wurden unter Eisbadkühlung 1,51 g (5 mmol) Octadecylsäurechlorid in 5 ml trockenem Chloroform getropft. Man ließ eine Stunde bei 0–5°C und 5 Stunden bei Raumtemperatur nachrühren. Der Ansatz wurde zunächst mit verdünnter Natronlauge, zuletzt mit Wasser gewaschen. Das Rohprodukt wurde zweimal aus Chloroform mit Petrolether 60/70°C gefällt.



Es wurden 64% der theoretischen Ausbeute des Produktes der obigen Formel mit einem Schmelzpunkt von 159°C erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, int. TMS): δ = 7,66–6,52 (Multipllett, aromatische Protonen); 3,42 (–CH₂CH₃), 1,22 (–CH₂CH₃).

In analoger Weise wurden auch die weiter vorn aufgeführten Verbindungen IVb bis IVi hergestellt. Einige spektroskopische Daten sind in Tab. 1 zusammengestellt.

Tabelle 1

Spektroskopische Daten amphiphiler Farbstoffe

Formel	Spektroskopische Daten in CH ₂ Cl ₂		
	Exc. max. λ (nm)	Em. max λ (nm)	Δ Stokes
IVa	406	476	70
IVe	528	549	21
IVf	475	511	36
IVg	531	585	54
IVh	460	495	35
IVi	368	452	84

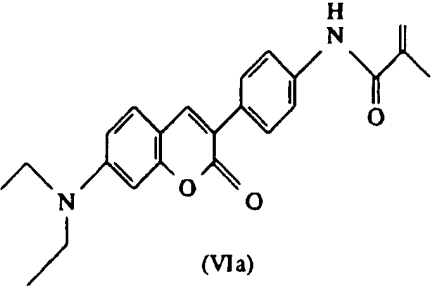
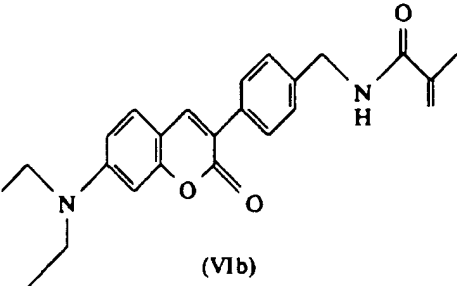
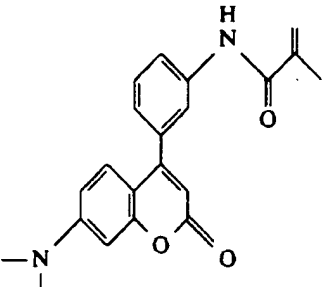
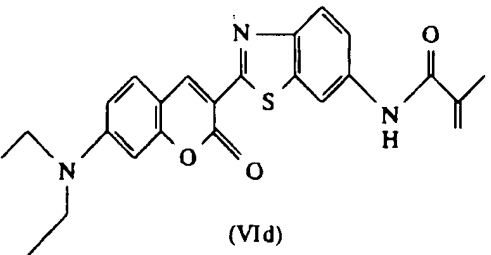
Beispiel 2

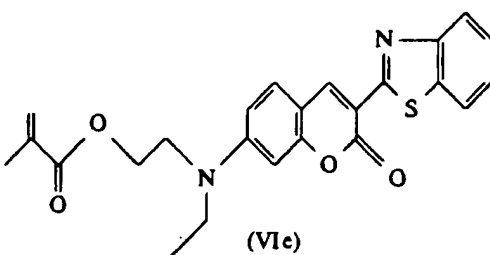
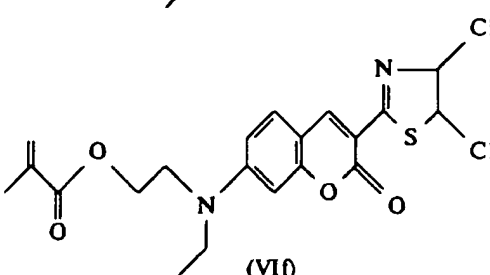
Herstellung eines polymerisierbaren Fluoreszenzfarbstoffs

- 5 Zu 1,53 g (5 mmol) 7-Diethylamino-3-(p-aminophenyl)-cumarin und 0,61 g (5 mmol) Triethylamin in 10 ml trockenem Chloroform wurden unter Eisbadkühlung 0,52 g (5 mmol) Methacrylsäurechlorid in 5 ml trockenem Chloroform getropft. Man ließ eine Stunde bei 0-5°C und 5 Stunden bei Raumtemperatur nachrühren. Der Ansatz wurde zunächst mit Natronlauge, zuletzt mit Wasser bis zur Salzfreiheit gewaschen und zur Trockne eingeeengt.
- 10 Ausbeute: 1,6 g entsprechend einer theoretischen Ausbeute von 86% des Produktes der weiter vorn aufgeführten Formel VIa mit einem Schmelzpunkt von 193–195°C.
¹H-NMR (CDCl₃, int. TMS): δ=9,43 (NH), 7,77–6,49 (Multipllett, arom. Protonen); 5,86 und 5,47 (H₂C=); 3,44 (–CH₂CH₃); 2,04 (=C–CH₃); 1,22 (–CH₂CH₃).
- 15 In analoger Weise wurden auch die weiter unten (Tab. 2) aufgeführten Verbindungen VIb bis VI f hergestellt. Einige spektroskopische Daten sind in Tab. 2 zusammengestellt.

Tabelle 2

Spektroskopische Daten polymerisierbarer Fluoreszenzfarbstoffe

Formel	Spektroskopische Daten in CH ₂ Cl ₂			
	Exc. max. λ (nm)	Em. max. λ (nm)	Δ Stokes (nm)	
 (VIa)	395	475	80	10 15 20
 (VIb)	401	475	74	25 30
 (VIc)	382	491	110	35 40 45
 (VIId)	456	507	51	50 55 60 65

Formel	Spektroskopische Daten in CH ₂ Cl ₂		
	Exc. max. λ (nm)	Em. max. λ (nm)	Δ Stokes (nm)
<div style="text-align: center;">  <p>(VIc)</p> </div>	528	546	17
<div style="text-align: center;">  <p>(VII)</p> </div>	450	496	46

Beispiel 3

Herstellung eines Fluoreszenzfarbstoff enthaltenden Polymeren

6,77 g (20 mmol) Octadecylmethacrylat, 4,00 g (20 mmol) (2,2-Dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)-methylenmethacrylat und 1,51 g (4 mmol) des Farbstoffmonomeren des Beispiels 2 wurden in 90 ml absolutem Dioxan gelöst und nach Zugabe von 1,44 g (0,2 Mol-%) Azo-bis(isobutyronitril) unter Rühren auf 65–70°C erwärmt und 16 Stunden lang bei dieser Temperatur gehalten. Nach Abkühlen wurde aus der Reaktionslösung das Polymer durch Eintragen in Wasser ausgefällt. Das Polymer wurde durch zweimaliges Lösen in Chloroform und Fällern in Methanol gereinigt.

Es wurden 3,93 g eines gelbgrünen Polymers erhalten, das durch Gelpermeationschromatographie in CH₂Cl₂ charakterisiert wurde. Gleichzeitige Detektion von Brechungsindex und UV-Spektroskopie lieferte identische Molekulargewichtsverteilungskurven, so daß ein gleichmäßiger Einbau des Fluoreszenzfarbstoffs in das Polymer gewährleistet war. Gegenüber einer Polystyrol-Eichung ergaben sich rechnerisch Molmassenwerte $M_n = 64\,000$ und $M_w = 1\,290\,000$ entsprechend einer Uneinheitlichkeit von 18,1.

Nach dieser allgemeinen präparativen Vorschrift wurden alle Methacrylat-Copolymere hergestellt.

Beispiel 4

Herstellung eines Schichtelements mit Fluoreszenzfarbstoff

a) Polymer Farbstoff

Ein durch Behandlung mit H₂O₂/H₂SO₄ gereinigter Objektträger aus Floatglas wurde bis zu einer Tiefe von 30 mm in die wäßrige Subphase einer Langmuir-Filmwaage (KSV 2200) eingetaucht. 150 µl einer Lösung der Verbindung der Formel (IIa) in Chloroform (1 mg/ml) wurden auf die Wasseroberfläche aufgespreitet. Nach dem Zusammenschieben der Schicht auf einen Oberflächendruck von 25 mN/m wurden durch sukzessives Aus- und Eintauchen (Tauchgeschwindigkeit: 10 mm/min) des Objektträgers drei monomolekulare Lagen Polymer übertragen. Die letzte Schicht wurde dabei beim Austauschen übertragen. Der Träger wurde anschließend an der Luft getrocknet. Eine Seite des Trägers wurde durch Reinigung mit Chloroform von der Farbstoffschicht befreit.

b) Polymer mit dispergiertem monomerem Farbstoff

Anstelle der Lösung des farbstoffhaltigen Polymers der Formel (IIa) wurde eine Mischung des Polymers der Formel (I), 1 mg/ml, und des monomeren amphiphilen Farbstoffs der Formel (IIIb) mit X=0, n=18, 1 mg/ml, im Verhältnis 4 : 1 verwendet.

Beispiel 5

Adsorption von Fluoreszenzfarbstoffen an ein Schichtelement und Beobachtung von

Fluoreszenz-Energietransfer

Ein nach Beispiel 4 hergestelltes Schichtelement wurde in eine Lösung von 10^{-7} mol/l Fluorescein in Phosphatpuffer, pH 7,0, 5 min lang getaucht. Vor und nach dem Versuch wurde ein Fluoreszenzspektrum aufgenommen. Das Emissionsspektrum verschob sich zum Maximum von Fluorescein hin.

5

Beispiel 6

Adsorption von fluoreszenzmarkiertem Protein an ein Schichtelement und Beobachtung von Fluoreszenz-Energietransfer

10

Ein nach Beispiel 4 hergestelltes Schichtelement wurde mit 50 µl einer Lösung von mit Tetramethylrhodamin-isothiocyanat (TRITC) markiertem Lectin Concanavalin A (1 mg/ml) betropft und ein zweiter, unbehandelter Objektträger gleicher Größe derart angepreßt, daß sich die Flüssigkeit gleichmäßig und ohne Luftblasen auf der Langmuir-Blodgett(LB)-Schicht verteilte. Nach einer Stunde Einwirkungszeit wurden beide Träger getrennt und der beschichtete dreimal mit wäßrigem Phosphatpuffer, 10 mmol/l, pH 6,8, gewaschen. Anschließend wurde ein Fluoreszenzspektrum gemessen und mit dem eines nicht mit Protein behandelten Schichtelements verglichen. Man erkannte eine zusätzliche Bande der TRITC-Emission. Wurden über die farbstoffhaltige LB-Schicht zwei bis sechs Farbstoff-freie Lagen aufgebracht, so sinkt die Intensität dieser Bande in Abhängigkeit von der Schichtdicke bis auf Null.

15

20

Es konnten 25 pmol TRITC-markiertes Protein nachgewiesen werden.

Patentansprüche

1. Optischer Biosensor auf der Basis des Fluoreszenz-Energietransfers, bestehend aus
 - a) einem festen Träger,
 - b) einer auf a) angebrachten ein- oder mehrlagigen Langmuir-Blodgett(LB)-Schicht,
 - c) mindestens einem Fluoreszenzfarbstoff F_1 , der in mindestens einer der oberen 4 Lagen der LB-Schicht angeordnet ist,
 - d) einem zur biologischen Wechselwirkung befähigten Molekül (Rezeptor), das in oder an der obersten Lage der LB-Schicht gebunden oder angeordnet ist, und
 - e) einem mobilen Fluoreszenzfarbstoff F_2 , dessen Anregungsbande für einen Energietransfer ausreichend mit der Emissionsbande von F_1 überlappt und der kovalent an einen Liganden gebunden ist, der an den Rezeptor bindungsfähig ist oder der kovalent an einen anderen Rezeptor gebunden ist, der an den Komplex aus erstem Rezeptor und Ligand bindungsfähig ist, wobei der Ligand bzw. der Ligand und der zweite Rezeptor zunächst nicht an die LB-Schicht gebunden sind.
2. Biosensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der verwendete feste Träger aus Glas, Quarzglas, Porzellan, Silizium, einem Kunststoff oder einem metallisierten Kunststoff besteht.
3. Biosensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Matrix der LB-Schicht ein Polymer ist.
4. Biosensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß F_1 kovalent an die Matrix gebunden ist.
5. Biosensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Farbstoff F_1 mit einer amphiphilen Matrix kognespreitet ist.
6. Biosensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Farbstoff F_1 in mindestens einer der beiden oberen Lagen der LB-Schicht angeordnet ist.
7. Biosensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Rezeptormolekül kovalent, bevorzugt über ein Spacermolekül, an die oberste LB-Schicht angebunden ist.
8. Biosensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Rezeptormolekül über einen hydrophoben Membrananker an die oberste Schicht angeordnet ist.
9. Biosensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß an die Bindungsstellen der Rezeptormoleküle ein fluoreszenzfarbstoffmarkierter oder selbstfluoreszierender Ligand gebunden ist.
10. Biosensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß zu der Analytenlösung ein zweites, mit dem Fluoreszenzfarbstoff F_2 markiertes Rezeptormolekül zugesetzt wird, das entweder spezifisch an den Komplex aus Rezeptor und Analyt oder an eine andere Domäne des Analyten als der Rezeptor in der Art eines Sandwich-Assay bindet.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

— Leerseite —

THIS PAGE BLANK (USPTO)